



PCT/FR2005/050192

REC'D 27 MAY 2005

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

26 AVR. 2005

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Valérie BITAUD bioMérieux Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE France
Vos références pour ce dossier: DIAZO TETA	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
	Réactifs de marquage, procédés de synthèse de tels réactifs et procédés de détection de molécules biologiques
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom Suivi par Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	BIOMÉRIEUX Laurent CAUCAL Chemin de l'Orme 69280 Marcy l'Etoile France France Société anonyme 673 620 399 04.78.87.53.28 04.78.87.21.16 catherine.duret@eu.biomerieux.com
5A MANDATAIRE	
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	BITAUD Valérie Liste spéciale, Pouvoir général: PG 10872 bioMérieux Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE 04.78.87.23.19 04.78.87.21.16 valerie.bitaud@eu.biomerieux.com

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet		textebrevet.pdf	47	D 37, R 9, AB 1	
Dessins		dessins.pdf	2	page 2, figures 2	
Désignation d'inventeurs					
Pouvoir général					
7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		3189			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Etablissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	15.00	225.00
Total à acquitter		EURO			545.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

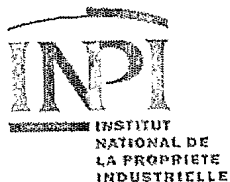
Signé par

Signataire: FR, BIOMERIEUX, V.Bitaud

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	26 mars 2004	
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0450600	Dépôt sur support CD:
Vos références pour ce dossier	DIAZO TETA	

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	BIOMÉRIEUX
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

Réactifs de marquage, procédés de synthèse de tels réactifs et procédés de détection de molécules biologiques

DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	application-body.xml	request.xml
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	

EFFECTUE PAR

Effectué par:	V.Bitaud
Date et heure de réception électronique:	26 mars 2004 13:23:16
Empreinte officielle du dépôt	DE:D4:88:41:CF:6F:06:F1:30:1D:D4:15:AC:CC:51:B0:9C:90:DE:F8

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersburg
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
LA PROPRIÉTÉ Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

DESCRIPTION

La présente invention concerne de nouveaux réactifs de marquage de molécules biologiques, un procédé de synthèse desdits marqueurs ainsi que des applications pour le marquage de molécules biologiques en particulier dans le domaine du diagnostic utilisant l'analyse des acides nucléiques..

L'état de la technique montre que de nombreuses méthodes existent pour marquer des nucléotides, des oligonucléotides ou des acides nucléiques.

Une première méthode consiste à fixer le marqueur sur la base, que celle-ci soit naturelle ou modifiée. Une deuxième méthode propose de fixer le marqueur sur le sucre, là encore qu'il soit naturel ou modifié. Une troisième méthode a pour objet la fixation du marqueur sur le phosphate.

Le marquage sur la base a été notamment utilisé dans l'approche de marquage des acides nucléiques par incorporation de nucléotides directement marqués.

Le marquage sur le sucre est souvent utilisé dans le cas des sondes nucléiques préparées par synthèse chimique.

Le marquage sur le phosphate a été aussi utilisé pour introduire des bras fonctionnalisés et des marqueurs lors de la synthèse chimique des oligonucléotides.

En fait l'homme du métier, qui doit effectuer un marquage d'un nucléotide, ou d'un analogue de nucléotide ou d'un acide nucléique, est enclin à effectuer cette fixation sur la base ou sur le sucre qui lui offrent plus de commodité et d'alternatives. C'est d'ailleurs ce qui ressort de l'étude de nombreux documents, tels que EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5,449,767, US-A-5,328,824, WO-A-93/16094, DE-A-3.910.151, EP-A-0.567.841 pour la base ou EP-A-0.286.898 pour le sucre.

La fixation du marqueur sur le phosphate est une technique plus complexe que la technique consistant à fonctionnaliser la base ou le sucre et a été bien moins utilisée notamment à cause de la faible réactivité du phosphate (voir par exemple Jencks W.P. et al J. Amer. Chem Soc., 82, 1778-1785, 1960). De même dans la revue de O'Donnel et Mc Laughlin (« Reporter groups for the

analysis of nucleic acid structure », p 216-243, dans « Bioorganic Chemistry : Nucleic Acids », Ed Hecht S.M., Oxford University Press, 1996) portant sur les méthodes d'introduction de sondes dans les fragments d'oligonucléotides, l'alkylation efficace du phosphodiester internucléotidique est considérée comme étant impossible.

5

La demande de brevet WO-A-99/65926 décrit un procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel qui consiste à fragmenter l'ARN et à marquer au niveau du phosphate terminal. Ce document décrit un certain nombre de fonctions pouvant être utilisées pour le marquage en liaison avec la fragmentation comme les fonctions hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxyamine, halogénure d'alkyle, halogénure d'alkyle de type benzylique et en particulier le dérivé 5-(bromométhyl)fluorescéine. Ces fonctions permettent de marquer les acides nucléiques, mais il faut associer une étape de fragmentation pour avoir un marquage efficace car ce marquage se produit sur le phosphate libéré lors de la fragmentation. De plus, il faut ajouter un excès important de réactif de marquage par rapport à l'ARN pour obtenir un marquage efficace ce qui induit des problèmes de bruit de fond générés par le marqueur en excès. Enfin, cette méthode ne fonctionne pas efficacement sur de l'ADN double brin.

15

Il existe donc un besoin pour de nouveaux réactifs qui soient efficaces du point de vue du rendement de marquage, qui soient spécifiques au niveau de la position de marquage et en particulier qui n'affectent pas les propriétés d'hybridation des bases impliquées dans la formation de la double hélice, par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes, qui soient utilisables à la fois pour l'ADN et l'ARN, et enfin qui permettent de marquer indifféremment des nucléotides, des oligonucléotides, des acides nucléiques naturels ou préparés par amplification enzymatique.

20

La Demanderesse a déjà proposé de tels nouveaux marqueurs qui répondent aux conditions précitées et qui utilisent la fonction diazométhyle comme fonction réactive pour le marquage. C'est par exemple le cas dans les demandes de brevet WO-A-02/090319 et WO-A-02/090584 ou dans l'article de Laayoun *et al.* paru dans Bioconjugate Chem. 2003, 14, 1298-1306 et intitulé : « Aryldiazomethanes for Universal Labelling of Nucleic Acids and Analysis on DNA Chips », auxquels

25

le lecteur peut se référer afin de mieux comprendre les modes de synthèse et d'utilisation de tels constituants.

Ainsi la fonction diazométhyle (de formule $-C(N_2)-$) a déjà été utilisée pour l'alkylation des groupements phosphates, mais un certain nombre de problèmes se posent. D'une part, les réactifs incorporant au moins une fonction diazo en général sont instables par eux-mêmes, ce qui pose des problèmes pour l'utilisation de ces réactifs dans un kit de marquage, ce qui est rédhibitoire si le produit marqué a pour fonction de mettre en évidence la présence d'une molécule cible biologique dans un échantillon quelconque.

Enfin les réactif portant la fonction diazométhyle et associés à certains marqueurs, tels que la biotine, sont peu solubles dans l'eau, ce qui conduit à utiliser des solvants organiques qui sont miscibles à l'eau pour le couplage avec des molécules biologiques, qui ne sont solubles que dans l'eau ou des tampons aqueux, mais ces solvants, présents en concentration importante dans la réaction de marquage, ralentissent la vitesse de réaction et donc nuisent à l'efficacité du couplage.

Les réactifs de marquage préconisés par les documents WO-A-02/090319 et WO-A-02/090584 ci-dessus mentionnés résolvent aussi ces problèmes techniques. Le contenu de ces demandes est incorporé ici pour référence.

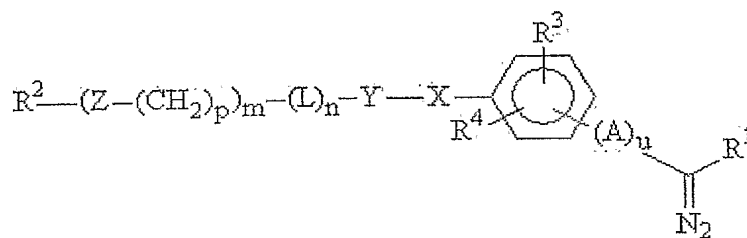
Toutefois même si ces molécules et procédés de marquage sont particulièrement efficaces, la Demanderesse a réussi à trouver de nouvelles molécules et de nouveaux procédés qui améliorent encore l'efficacité du marquage. L'invention consiste en l'utilisation de bras polyaminés qui, à l'instar des bras éthylèneglycols, permettent l'éloignement de la biotine par rapport au centre réactif (fonction diazo). Ainsi on obtient une meilleure solubilité en milieu aqueux, grâce à l'introduction du bras hydrophile, avec la possibilité de protonation des amines en milieu aqueux à pH neutre, ce qui produit une attraction entre les acides nucléiques, chargés négativement et le marqueur avec deux conséquences principales :

- marquage plus rapide, ce qui peut être particulièrement intéressant pour les échantillons à faible concentration, et

- stabilisation de la double hélice par neutralisation des charges négatives des phosphates.

De plus ces nouvelles molécules permettent la mise en œuvre de procédés pouvant fonctionner en milieu acide, ce qui est particulièrement intéressant pour des molécules incorporant des fonctions diazo. Ainsi la sélectivité des réactifs portant une fonction diazo est donc plus importante en milieu acide. La solubilité apportée aux chaînes polyamides facilite donc le lavage tout en diminuant le bruit de fond lors de la détection ultérieure, voire même l'élimination pure et simple de l'étape de purification

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, celle-ci propose un réactif de marquage stable à la température de formule (0) :

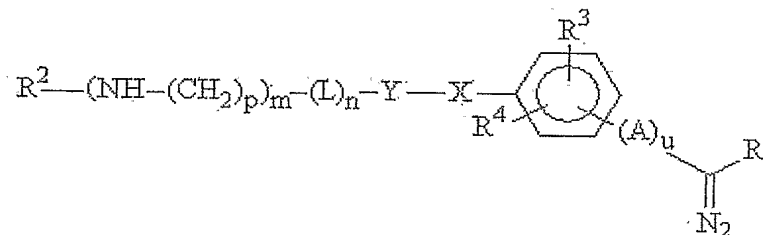


dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$, $COOR$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2-NH-R^2$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_4-CH_2-NH-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1,
- -Y-X- représente $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$,
- -Z- représente $-NH-$, $-NHCO-$, $-CONH-$ ou $-O-$,

- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, celle-ci concerne un réactif de marquage, selon la revendication 1, de formule (1) :



5

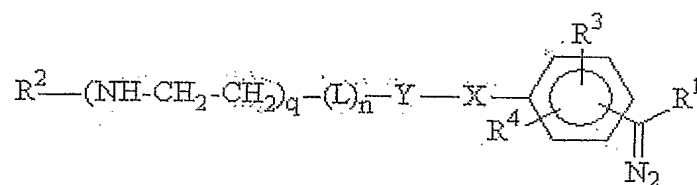
dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 10 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle, et
- 15 • $-Y-X-$ représente $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

Avantageusement, selon une variante des deux premiers modes de réalisation, la valeur p est inférieure ou égale à la valeur m dans la formule (0) ou (1) du réactif.

20

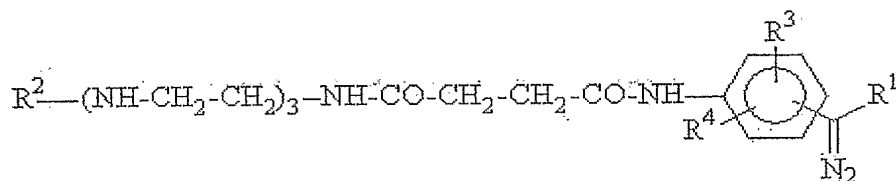
Selon un troisième mode de réalisation, la présente invention propose un réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, de formule (2) :



dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle, et
- q est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3

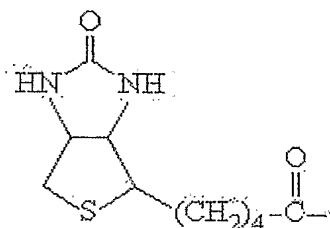
Selon un quatrième mode de réalisation, la présente invention décrit un réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, de formule (3) :



dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle.

Selon une variante associée au quatrième mode de réalisation de l'invention, R^2 est constitué par un résidu D-Biotine de formule (4):

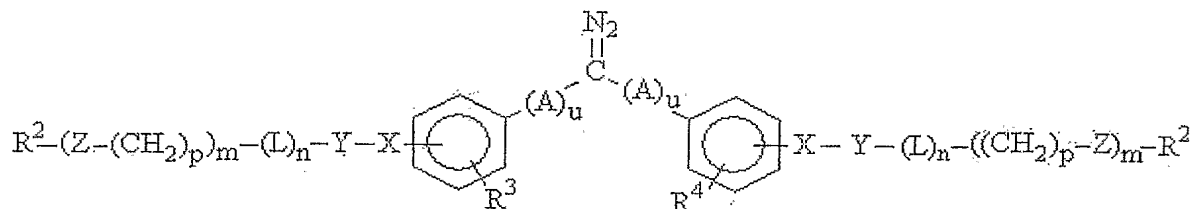


Avantageusement et quel que soit le mode de réalisation précédemment évoqué du réactif, R^1 est constitué de : CH_3 , et R^3 et R^4 représentent chacun : H

Avantageusement et quel que soit le mode de réalisation ou variante précédemment évoqué(e) du réactif, la structure $-(L)_n-$ est constituée par :

- la spermine ou N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane : $NH_2-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, ou
- la spermidine ou N-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamine : $H_2N-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, ou
- un dérivé contenant un motif alanine : $NH_2-CH_2-CH_2-COOH$.

Selon un cinquième mode de réalisation de l'invention, celle-ci a trait également un réactif de marquage stable à la température de formule (6) :

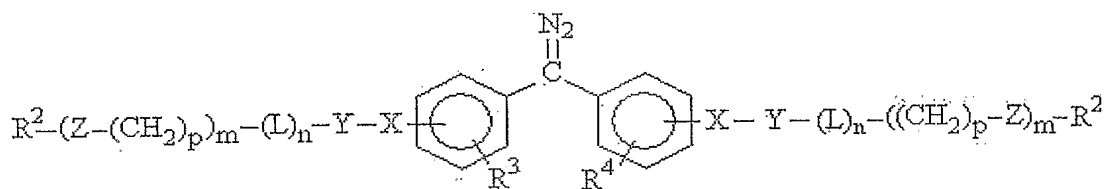


dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$, $COOR$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2-NH-R^2$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_4-CH_2-NH-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,

- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1,
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-,
- 5 • -Z- représente -NH-, -NHCO-, -CONH- ou -O-,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

Selon un sixième mode de réalisation, l'invention propose un réactif de marquage stable à la température de formule (7) :



10

dans laquelle :

- R¹ représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R² représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- 15 • L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R³ et R⁴ représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² avec R = alkyle ou aryle,
- 20 • -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-,
- -Z- représente -NH-, -NHCO-, -CONH- ou -O-,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

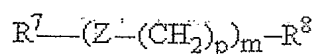
Avantageusement et quel que soit le mode de réalisation ou variante précédemment
25 évoqué(e) du réactif, L comprend un motif -(O-CH₂-CH₂)-, répété de 1 à 20 fois,

préférentiellement de 1 à 10 fois, et encore plus préférentiellement de 2 à 5 fois, -Z- étant alors représenté par -NH-, -NHCO- ou -CONH-.

L'invention concerne également un procédé de synthèse d'un réactif de marquage, selon les modes de réalisation précédents, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive R^6 ,

b) on dispose d'un bras de liaison de formule (8) :

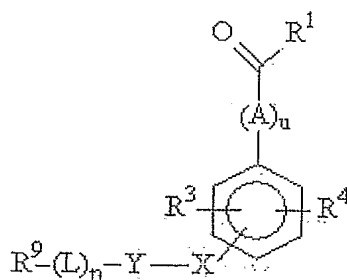


dans laquelle :

- -Z- représente -NH-, -NHCO-, -CONH- ou -O-,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3,
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3,
- R^7 et R^8 représentent deux fonctions réactives identiques ou différentes,

c) on fait réagir ensemble la fonction réactive R^6 dudit marqueur ou précurseur de marqueur avec la fonction R^7 du bras de liaison de formule (8) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente, R^6 et R^7 étant complémentaires,

d) on dispose d'un dérivé de formule (9) :



dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,

- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- $-Y-X-$ représente $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$,

5 • A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier égal à 0 ou 1, et

- R^9 représente une fonction réactive complémentaire de R^8 ,

e) on fait réagir ensemble la fonction réactive R^9 du dérivé de formule (9) avec la fonction
10 R^8 du bras de liaison de formule (8) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente,

f) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

g) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

15 Avantageusement, le procédé de synthèse peut également comprendre :

- une étape supplémentaire de protection de la fonction cétone ou aldéhyde du composé (9), et
- une étape supplémentaire ultérieure de déprotection de ladite fonction cétone ou aldéhyde.

L'invention concerne aussi un procédé pour le marquage d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique, comprenant la mise en contact en solution homogène, dans un tampon
20 sensiblement aqueux, d'une molécule biologique et d'un réactif, selon les modes de réalisation précédemment évoqués.

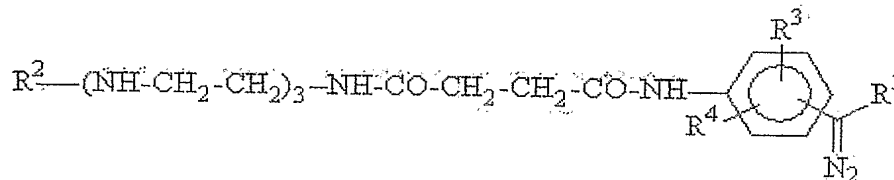
L'invention concerne encore une molécule biologique marquée susceptible d'être obtenue par le procédé, selon la revendication de marquage ci-dessus.

25 L'invention concerne également un procédé de marquage et de fragmentation d'un acide nucléique simple ou double brin comprenant les étapes suivantes :

- fragmenter l'acide nucléique,
- attacher un marqueur sur au moins un des fragments par l'intermédiaire d'un réactif de marquage choisi parmi les réactifs, selon les modes de réalisation précédemment évoqués,

ledit réactif se couplant de manière covalente et majoritaire sur au moins un phosphate dudit fragment.

Avantageusement le procédé de marquage et de fragmentation s'effectue à l'aide d'un réactif de marquage qui est choisi parmi les composés de formule (3) :



dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle.

Selon une première variante de réalisation du procédé de marquage et de fragmentation, la fragmentation et le marquage sont effectués en deux étapes.

Selon une seconde variante de réalisation du procédé de marquage et de fragmentation, la fragmentation et le marquage sont effectués en une étape.

Quel que soit le procédé de marquage et de fragmentation, le marquage s'effectue en solution homogène sensiblement aqueuse.

Quel que soit le procédé de marquage et de fragmentation, la fragmentation s'effectue par voie enzymatique, physique ou chimique.

La présente invention concerne aussi tout acide nucléique marqué susceptible d'être obtenu par le procédé de marquage et de fragmentation précédent.

La présente invention concerne encore un kit de détection d'un acide nucléique cible comprenant un acide nucléique marqué, tel que défini ci-dessus.

5 La présente invention concerne toujours un support solide sur lequel est fixé au moins un réactif, tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne enfin un procédé de capture d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :

- 10 • on dispose d'un support solide sur lequel est fixé directement ou indirectement au moins une molécule biologique, définie précédemment, ou un acide nucléique, défini également précédemment, la molécule biologique ou l'acide nucléique comprenant une fonction diazométhyle,
- on met en contact un échantillon biologique susceptible de contenir des acides nucléiques libres, et
- 15 • on lave le support solide où la (ou les) molécule(s) sont fixée(s) de manière covalente au moins à un acide nucléique.

Par « structure multimérique », on entend un polymère formé d'unités répétées de synthons chimiques ou biologiques. Un exemple est cité dans l'exemple 34.2 de la description de la demande
20 de brevet WO-A-02/090319. L'homme du métier est invité à se référer à ce document si celui-ci trouvait les informations ci-après développées insuffisantes pour sa complète compréhension sur ce sujet. De nombreuses variantes de telles structures utilisables dans la présente invention sont connues, comme par exemple :

- 25 • les polymères linéaires (EP-A-0.561.722, EP-A-0.669.991),
- les polymères ramifiés (WO-A-01/92361),
- les particules (EP-A-0 827 552),
- les dendrimères (US-A-4,507,466 ; US-A-4,568,737 ; US-A-6,083,708),
- les polynucléotides, et
- les polypeptides.

Si cela s'avérait nécessaire, l'homme du métier peut également se référer à ces documents pour une parfaite compréhension sur ce sujet.

Par « marqueur détectable », on entend au moins un marqueur capable de générer
5 directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs suit :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- 10 • les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leur propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, l'impédance,
- les groupements détectables, par exemple dont les molécules sont de tailles suffisantes pour induire des modifications détectables de leurs caractéristiques physiques et/ou chimiques, cette détection peut être réalisée par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance
15 plasmon de surface, la variation de surface, la variation d'angle de contact ou des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel,
- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I .

De préférence, le marqueur n'est pas un marqueur radioactif pour éviter les problèmes de sécurité liés à ces marqueurs.

20 Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention le marqueur est détectable électrochimiquement, et en particulier le marqueur est un dérivé d'un complexe de fer, comme un ferrocène.

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier,
25 ce qui est le cas par exemple des couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/ complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte la fonction réactive diazométhyle. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-

même détectable par un autre couple ligand/anti-ligand. Ce système d'empilement est illustré dans les exemples.

Un autre exemple de systèmes indirects utilise une liaison covalente spécifique entre le ligand et l'anti-ligand par exemple méthylcétone et alcoxyamine. Des exemples de ce système sont décrits dans les demandes de brevet WO-A-00/40590 et WO-A-98/05766. Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures WO-A-00/07982, WO-A-01/92361 et WO-A-95/08000 pour des exemples d'amplification chimique en utilisant des polymères ou à la demande WO-A-01/44506 pour les systèmes d'amplification chimique par empilement.

Dans un mode particulier de l'amplification de signal, au moins deux marqueurs sont présents sur le réactif de marquage.

Dans un mode préféré de l'invention, le traceur est un composé fluorescent de faible encombrement stérique comme la fluorescéine, l'hexachlorofluorescein (HEX), le dansyl (edans), la rhodamine, la tetramethylrhodamine (5 ou 6-TAMRA), la carboxy-X-rhodamine (ROX), les chromophores du type NIR (LI-COR Inc, Lincoln NE, USA), des dérivés cyanines comme le Cy5 et le Cy3 (Randolph J.B. and al, Nucleic Acids Res., 25(14), p2923-2929, 1997) et en particulier les dérivés du Cy5 ou bien le traceur est un haptène de faible encombrement stérique comme la biotine, le dinitrohenyle, ou un dérivé de l'abiétane (voir la demande WO-A-00/07982). Par faible encombrement stérique, on entend un poids moléculaire inférieur à 1000 g/mole.

Dans le cas d'un fluorophore, il est préférable de travailler avec des fluorophores dont la longueur d'onde d'excitation est supérieure à 450 nm, de préférence supérieure à 600 nm.

Dans le cas où le traceur est un haptène qui ne produit pas de signal par lui-même comme par exemple la biotine, la détection est réalisé par la reconnaissance d'un anti-ligand marqué comme décrit plus haut. Dans le cas de la biotine, on utilise de préférence de la streptavidine ou un anticorps anti-biotine couplé à un composé fluorescent comme la fluorescéine, Cy5 ou la phycoérythrine. Dans le cas de l'abiétane, on utilise un anticorps monoclonal comme décrit dans la demande de brevet WO-A-00/07982.

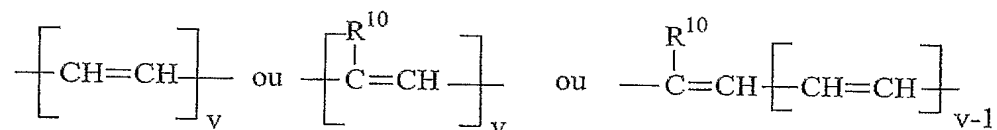
En particulier les réactifs de marquage de l'invention sont solubles dans des solvants polaires comme le DMF, le DMSO, CH_3CN , THF, DMA (diméthylacétamide), NMP (N-méthylpyrrolidone), DME (diméthoxyéthane).

5 De préférence les réactifs de marquage sont solubles dans le DMSO ou l'eau.

Par solvant miscible à l'eau, on entend un solvant qui est miscible dans une proportion d'au moins 5% en volume avec de l'eau ou un tampon aqueux contenant des sels.

Avantageusement dans les formules précédentes, le bras L comprend un motif éthylène glycol ou polyéthylène glycol pour augmenter la solubilité du réactif dans l'eau.

10 A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison de type éthylénique permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique. Le bras de liaison A a pour fonction d'éloigner la fonction diazométhyle du cycle pour diminuer l'encombrement stérique tout en conservant la stabilité de la fonction diazométhyle. Par « conjugaison », on entend la délocalisation électronique du cycle aromatique le long de la chaîne carbonée du bras de liaison A. A titre d'exemple, le bras A peut avoir la structure suivante :



dans laquelle :

- v est un nombre entier compris entre 1 et 10, de préférence v est 1 ou 2, et
- R^{10} est H ou un groupement alkyle, de préférence R^{10} est H, méthyle ou éthyle.

20 Ces réactifs peuvent ainsi se fixer en phase homogène sur les molécules biologiques, la phase homogène étant constituée d'une solution sensiblement aqueuse c'est à dire contenant au moins 50% d'eau.

Par « molécule biologique », on entend un composé qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique. A titre d'exemple on peut citer comme molécules biologiques les acides nucléiques, les antigènes, les anticorps, les polypeptides, les protéines, les haptènes.

Le terme « acide nucléique » signifie un enchaînement d'au moins deux désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée, telle que l'inosine, la méthyl-5-déoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkyl-phosphonates, au niveau du squelette comme par exemple les alpha-oligonucléotides (FR 2 607 507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992 ou les 2' O-alkyl ribose. L'acide nucléique peut être naturel ou synthétique, un oligonucléotide, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique, un ARN ribosomique, un ARN messager, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique telle que :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, et sa dérivée RT-PCR (Reverse Transcription PCR), notamment dans un format en une étape, tel que décrit dans le brevet EP-B-0.569.272,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.
- RCA (Rolling Circle Amplification (US-6,576,448).

On parle alors d'amplicons pour désigner les acides nucléiques générés par une technique d'amplification enzymatique.

Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison pour peu qu'au moins un phosphate soit présent dans l'acide nucléique.

Par « polypeptide », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés.

Par « acides aminés », on entend :

- les acides aminés primaires qui codent pour les protéines,
- les acides aminés dérivés après action enzymatique, comme la trans-4-hydroxyproline,
- les acides aminés naturels, mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la N-méthyl-L leucine, la sialine (voir Hunt S. dans *Chemistry and Biochemistry of the amino acids*, Barrett G.C., ed., Chapman and Hall, London, 1985), et
- les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

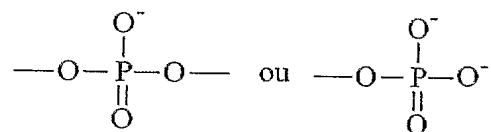
Le terme « haptène » désigne des composés non immunogènes, c'est-à-dire incapables par eux-mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production d'anticorps, mais capables d'être reconnues par des anticorps obtenus par immunisation d'animaux dans des conditions connues, en particulier par immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le plus souvent inférieure à 2000 Da et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les nucléosides et nucléotides.

Le terme « anticorps » inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique, et des fragments d'anticorps tels que des fragments Fab ou $F(ab')_2$.

Le terme « antigène » désigne un composé susceptible de générer des anticorps.

Le terme « protéine » inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métalloprotéines et les glycoprotéines, aussi bien fibreuses que globulaires sous leur forme conformationnelle caractéristique.

Avantageusement la molécule biologique possède un groupe phosphate, c'est-à-dire ayant au moins un motif :



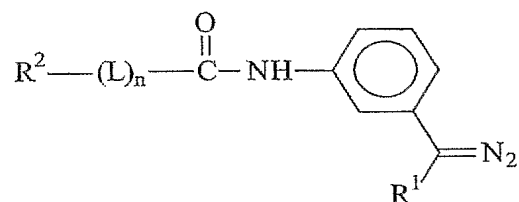
qui est soit présent naturellement dans la molécule biologique, soit peut être introduit par exemple par modification chimique ou enzymatique. Des exemples de modification chimique pour les protéines sont données dans « Chemistry of protein conjugation and cross linking », S.S. Wong, CRC Press, 1991.

5

De préférence, la molécule biologique est un acide nucléique.

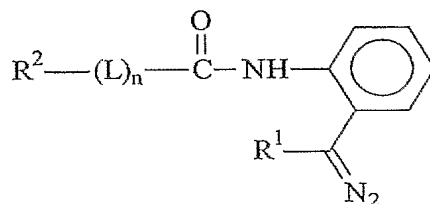
Certains réactifs avantageux de l'invention sont :

a) de formule (10) :

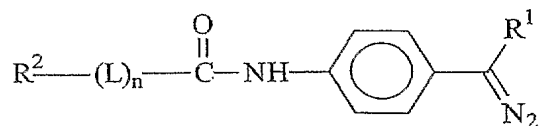


10

b) de formule (11) :



c) de formule (12) :

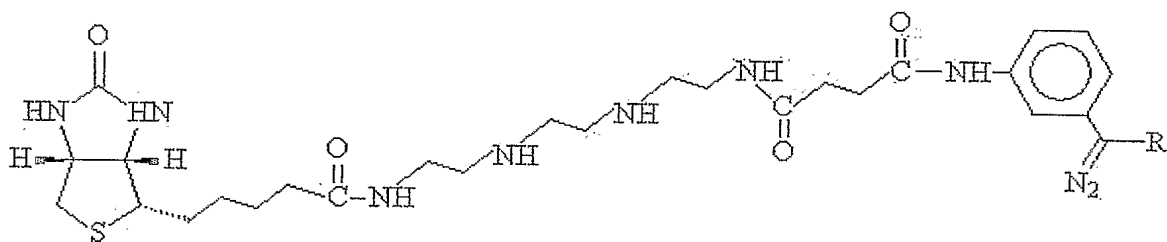


15 dans lesquelles :

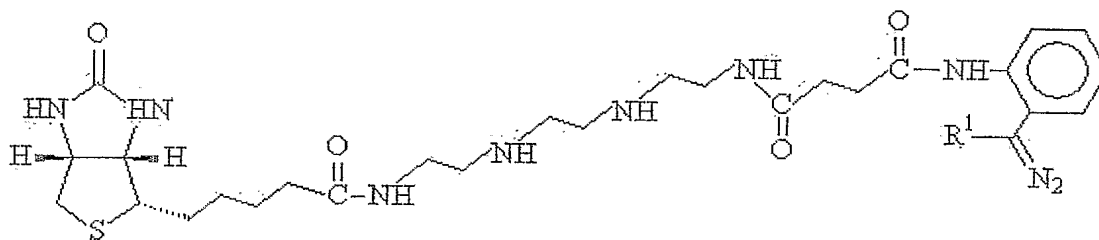
- R^1 représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes,
- 20 et
- n un nombre entier égal à 0 ou 1.

De préférence, le réactif de marquage a la :

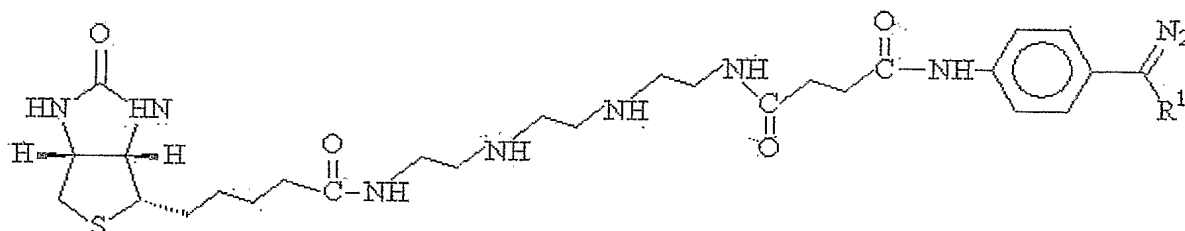
a) formule (13) :



b) formule (14) :



c) formule (15) :



dans lesquelles R^1 représente un groupe méthyle ou phényle.

10

Quels que soient la variante et le mode de réalisation du réactif, L peut comprendre un motif $-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)-$, répété de 1 à 20 fois, préférentiellement de 1 à 10 fois, et encore plus préférentiellement de 2 à 5 fois.

15

Par « dérivé de l'hydrazine », on entend une molécule possédant la fonction $\text{NH}_2-\text{NH}-$. Le tosylhydrazine est un exemple d'un tel dérivé.

La transformation de l'hydrazone en diazométhyle est réalisée par les méthodes usuelles, en particulier l'oxydation par MnO_2 .

D'autres méthodes sont utilisables comme décrites dans X. Creary, Organic Syntheses, Wiley: New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990; H. Zollinger, Diazo Chemistry II, VCH, Weinheim, p34-47, 1995; T. L. Holton and H. Shechter, J. Org. Chem., 60, 4725-4729, 1995.

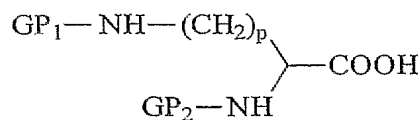
Dans le cas de l'utilisation d'un dérivé tosylhydrazine, la méthode est décrite dans X. Creary, Organic Syntheses; Wiley: New York, Coll. Vol. VII, p438-443, 1990.

Dans un mode particulier de l'un quelconque des procédés de synthèse, ledit procédé comprend :

- une étape supplémentaire de protection de la fonction cétone ou aldéhyde (dans le cas où R^1 est H) du composé (9), et
- une étape supplémentaire ultérieure de déprotection de ladite fonction cétone ou aldéhyde.

Cette protection est réalisée par un groupement acétal par exemple. La déprotection est effectuée par un moyen approprié comme en milieu acide pour le groupement acétal. L'homme du métier détermine en fonction des composés à quelle étape de synthèse ces deux étapes de protection et de déprotection interviennent.

Dans le cas de l'amplification de signal, le procédé de synthèse est similaire à ceux évoqués précédemment. Le précurseur du marqueur peut avoir la formule (17) ci-dessous.

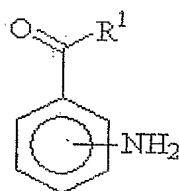


dans laquelle GP_1 et GP_2 représentent deux groupements protecteurs de fonction amine identiques ou différents et p est un nombre entier compris entre 1 et 10, avantageusement 2 et 6 de préférence 4. Avantageusement, GP_1 et GP_2 sont différents pour pouvoir additionner plusieurs motifs comme cela est expliqué ci-dessous.

Des exemples de groupement protecteurs GP1 ou GP2 utilisables dans la présente invention sont données dans T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2^{ème} édition, John Wiley and Sons, New York, 1991, préférentiellement ceux couramment utilisés en synthèse peptidique comme Boc (tertiobutyloxycarbonyle), Fmoc (9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle), Cbz (carboxybenzyle) ou Alloc (allyloxycarbonyle).

En particulier GP1 et GP2 sont respectivement les groupements protecteurs Boc et Fmoc.

La réaction entre ce précurseur qui possède une fonction carboxylique et le dérivé de formule (18), ci-après a lieu en présence d'un agent de couplage pour former la liaison amide.



10

Après déprotection dans des conditions usuelles d'un des deux groupements protecteurs, par exemple Fmoc avec une base telle que la pipéridine, la fonction amine libérée est utilisée pour coupler une autre molécule de formule (17). Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir une multitude de fonctions NH_2 protégé par un groupement protecteur par exemple une fonction Boc. Le motif est additionné entre une (1) et cent (100) fois, de préférence entre une (1) et vingt (20) fois.

15

On fait réagir de l'hydrazine sur la fonction cétone provenant du dérivé phénylcétone pour former une hydrazone puis on oxyde en présence de MnO_2 pour former un résidu diazométhyle. Puis après déprotection de la fonction amine portant le groupement Boc, un traceur, par exemple une biotine activée par un groupement N-hydroxysuccinimide, est couplé sur les fonctions amines pour conduire à un réactif dont le motif $\text{R}^2-(\text{L})_n-$ est celui de la formule (5).

20

C'est un autre objet de la présente invention que de décrire un procédé, ainsi que les produits obtenus par ce procédé, pour le marquage d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique, comprenant la mise en contact en solution, dans une solution homogène sensiblement aqueuse, d'une molécule biologique et d'un réactif de marquage selon l'invention.

25

Par « solution sensiblement aqueuse », on entend une solution contenant au moins 50% d'eau. Cette solution contient de préférence des sels comme une solution tampon.

Par « solution homogène », on entend une solution monophasique telle qu'une solution eau/DMSO par opposition à une solution biphasique telle qu'une solution eau/chloroforme. Les conditions particulières pour les réactions de marquage varient en fonction des molécules biologiques et du marqueur. En ce qui concerne les acides nucléiques, un pH compris entre 5 et 8 permet un marquage efficace. En particulier, un pH compris entre 5,5 et 7,0 est préféré pour l'ensemble des réactifs de l'invention. Avec le réactif de formule (11), la gamme de pH est plus large pour le marquage. Une bonne efficacité de marquage est obtenue pour un pH compris entre 3 et 8 pour ce réactif.

Ce procédé de marquage et de fragmentation est particulièrement utile dans le cas où l'acide nucléique marqué doit s'hybrider avec une multitude d'acides nucléiques, notamment oligonucléotides, fixés sur le support solide à une position prédéterminée pour former une puce à ADN. Par "puce à ADN", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées. En effet, la densité des acides nucléiques fixés sur le support solide impose des contraintes stériques importantes lors de l'hybridation et la fragmentation permet d'améliorer cette étape d'hybridation. Des exemples de ces puces à ADN sont donnés par exemple dans les publications de G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16, p40-44, 1998; F. Ginot, *Human Mutation*, 10, p1-10, 1997; J. Cheng et al, *Molecular diagnosis*, 1(3), p183-200, 1996; T. Livache et al, *Nucleic Acids Research*, 22(15), p2915-2921, 1994; J. Cheng et al, *Nature Biotechnology*, 16, p541-546, 1998.

La fragmentation et le marquage s'effectuent en une étape ou en deux étapes et le marquage peut s'effectuer indifféremment avant, après ou simultanément avec la fragmentation.

De préférence, le marquage et la fragmentation s'effectuent simultanément c'est-à-dire que les réactifs nécessaires à ces deux étapes sont mis ensemble en solution homogène sensiblement aqueuse avec l'acide nucléique par exemple. C'est notamment le cas pour la fragmentation chimique ou enzymatique. Dans le cas de la fragmentation mécanique par un moyen physique, «marquage et

fragmentation s'effectuant simultanément » signifie que le moyen physique est appliqué à une solution homogène sensiblement aqueuse contenant au moins les acides nucléiques et le réactif de marquage.

La fragmentation de l'acide nucléique s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

5 La fragmentation par voie enzymatique de l'acide nucléique est réalisée par exemple par des nucléases.

La fragmentation par voie physique de l'acide nucléique est réalisée par exemple par sonication ou par radiation.

10 La fragmentation par voie chimique, si l'acide nucléique est un ARN, est réalisée par les méthodes usuelles (voir par exemple Chem. Rev, 98, 961-990, 1998 de Oivanen M. *et al.*).

Les complexes de métaux, tels que décrits dans la revue de G. Pratviel et al, Adv. Org. Chem., 45, p251-312, 1998 ou la revue G. Pratviel *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34, p746-769, 1995, sont utilisables pour la fragmentation de l'ADN ou l'ARN.

15 Dans un premier mode de réalisation, la fragmentation chimique d'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un catalyseur chimique. Dans ce cas, les cations métalliques sont des ions Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ru^{3+} , Ce^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} ou Lu^{3+} , le catalyseur chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué, par exemple le N-méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant un noyau imidazole ou un analogue substitué. Les conditions de fragmentation à l'aide de
20 métaux sont bien décrites dans la demande de brevet WO-A-99/65926. Avantageusement, les métaux sont Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Tb^{3+} ou Ce^{3+} , de préférence Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} .

Des conditions efficaces de fragmentation sont obtenues avec une concentration en cation métallique comme Mn^{++} entre 2 et 100 mM, une concentration en imidazole entre 2 et 100mM.

25 Des conditions spécialement efficaces sont obtenues avec une concentration en cation comme Mn^{++} comprise entre 3 et 15 mM, et une concentration en imidazole comprise entre 20 et 50 mM, en particulier 30 mM.

Le pH de la réaction doit être légèrement basique. Avantageusement, le pH est compris entre 8,5 et 9, ce qui représente un compromis très intéressant pour réaliser la combinaison marquage et fragmentation avec de l'ARN.

Dans un deuxième mode de réalisation, la fragmentation chimique de l'ARN est réalisée par action d'une polyamine, comme la spermine, la putrescine ou la cadavérine. Des concentrations de 5 à 100 mM permettent la fragmentation. Celle-ci est totale à partir de 10 mM de polyamine.

Dans un troisième mode de réalisation, la fragmentation chimique de l'ARN est réalisée par action d'une nucléase artificielle (voir G. Pratviel *et al.*, Adv. Inorg. Chem., 45, p251-312, 1998; D. S. Sigman *et al.* Chem. Rev., 93, p2295-2316, 1993), comme la 1,10-phénanthroline associée à un cation métallique comme le fer, le cuivre ou le zinc. Ces cations proviennent respectivement de FeSO₄ ou CuCl₂ ou ZnCl₂ en solution. Des concentrations entre 2 et 50 mM de 1,10-phénanthroline sont utilisées pour la fragmentation d'ARN en particulier entre 4 et 10 mM.

La fragmentation par voie chimique de l'ADN est réalisée en mettant en présence l'acide nucléique avec un moyen chimique de création de site abasique. La formation d'un site abasique résulte de la coupure de la liaison N-glycosidique qui lie le sucre 2-désoxyribose à la base nucléique. Il s'agit d'une dépurination par la perte d'une purine (guanine, adénine), chargée négativement, ou d'une dépyrimidination dans le cas de la perte d'une pyrimidine (cytosine, thymine), chargée positivement.

Cette dépurination est spontanée dans des conditions physiologiques (pH 7,4 à 37°C) mais la vitesse de la réaction est très faible de l'ordre de $3 \cdot 10^{-11}$ dépurination par seconde, c'est-à-dire inutilisable pour une fragmentation efficace. Pour augmenter la vitesse de réaction, on utilise des agents alkylants qui fragilisent la liaison N-glycosidique ou des uracile-ADN glycosilases sur des ADN incorporant des uracyles.

Le site abasique obtenu par dépurination ou dépyrimidation est très instable. La fragmentation au niveau de ce site est obtenue à température ambiante en milieu basique. En milieu acide, la température élevée accélère également cette fragmentation. L'utilisation de molécules capables d'initier le phénomène de β -élimination accélère aussi la fragmentation.

Un mode préféré de réalisation de la fragmentation est obtenu par l'utilisation d'un pH acide c'est-à-dire un pH inférieur à 5. Avantageusement le pH est de 3.

Un tampon formiate de sodium à pH 3 permet de fragmenter de manière efficace selon l'invention. Ce tampon est compatible avec les conditions de marquage en une étape comme cela

sera démontré dans les exemples. Encore plus avantageusement, un milieu acide (HCl, carbonate, H_2SO_4) est utilisé.

5 Dans un mode particulier de la présente invention et dans le but d'augmenter encore la fragmentation, l'acide désoxyribonucléique contient au moins une base modifiée susceptible de générer un site abasique plus facilement.

Diverses bases modifiées sont utilisables comme les N7-alkyl purines, les N3-alkyl purines, les O6-alkyl purines, les 8-bromopurines, les 8-thiopurines, les 8-alkylthiopurines, les 8 azidopurines
10 ou les 8-alkylsulfonylpurines.

Dans le cas où l'acide nucléique à marquer serait généré par une technique d'amplification enzymatique comme la PCR, l'utilisation d'une 8-bromopurine permet d'avoir une incorporation efficace pendant l'amplification, ce qui facilite d'autant le procédé de fragmentation et de marquage
15 selon l'invention, tout en conservant une sensibilité excellente pour l'étape d'amplification enzymatique.

La présente invention décrit une molécule biologique marquée et en particulier un acide nucléique marqué, susceptible d'être obtenu(e) par l'un quelconque des procédés selon l'invention.
20

La présente invention concerne aussi un kit de détection d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique cible comprenant un réactif de marquage selon l'invention. En fonction des applications du kit, d'autres éléments comme par exemple, des moyens de lyse (micro-organismes et/ou cellules) et/ou des moyens de concentration (comme de la silice ou des particules
25 magnétiques) et/ou des moyens d'amplification enzymatique sont incorporés dans le kit.

L'invention concerne l'utilisation d'une molécule biologique marquée, en particulier un acide nucléique marqué tel que défini ci-dessus, comme sonde de détection d'une molécule biologique cible, et en particulier d'un acide nucléique cible.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, comme cible marquée pouvant se fixer sur une sonde de capture.

5 Pour permettre la détection et/ou la quantification et/ou la purification de la molécule biologique cible, la molécule biologique marquée est capable de former un complexe avec la molécule biologique cible. A titre d'exemple, pour la mise en évidence d'une molécule cible de type acide nucléique, l'acide nucléique marqué est suffisamment complémentaire de la cible pour s'hybrider spécifiquement en fonction des conditions de réaction, et notamment de la température ou
10 de la salinité du milieu réactionnel.

Le procédé de détection est applicable pour le séquençage, le profil d'expression des ARN messagers ou le criblage de mutations à des fins de recherche ainsi que le criblage de drogues dans l'industrie pharmaceutique, le diagnostic de maladies infectieuses ou génétiques, le contrôle alimentaire ou industriel.

15 La tendance en matière de diagnostic et notamment pour les maladies infectieuses (SIDA ou Tuberculose par exemple) est de baisser le niveau de sensibilité, jusqu'à la détection d'une molécule unique dans un échantillon qui peut représenter plusieurs millilitres dans le cas d'un prélèvement liquide type sang ou urine ou liquide céphalo-rachidien. Ce niveau de sensibilité ne peut être obtenu que si toutes les étapes depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'au rendu de résultat sont
20 optimisées. Les différents moyens de l'invention permettent cette optimisation sans difficulté car les réactifs, méthodes et procédés de l'invention sont applicables de manière très large à différentes molécules biologiques. En particulier dans le cas où une étape d'amplification enzymatique est nécessaire pour obtenir la sensibilité nécessaire (infection virale ou bactérienne comme VIH, VHC ou Tuberculose), un procédé de marquage et/ou de fragmentation, comme décrit dans la présente
25 invention, permet de ne pas affecter la sensibilité de la technique d'amplification, soit parce qu'il n'est pas nécessaire de remplacer les désoxyribonucléotides ou les ribonucléotides utilisés dans la technique d'amplification enzymatique, soit parce que les ribonucléotides ou désoxyribonucléotides incorporés n'altèrent pas la sensibilité.

La chimie de greffage décrite dans la présente invention possède des caractéristiques telles, du point de vue réactivité et spécificité, que d'autres applications sont décrites ci-après :

- Dans un premier mode de réalisation, cette chimie de greffage est appliquée à la fixation covalente d'acides nucléiques sur un support solide.
- 5 • Dans une première variante du procédé, un précurseur de la fonction diazométhyle, tel une cétone ou hydrazine comme décrit précédemment, est introduit pendant la synthèse chimique et la fonction diazométhyle est introduite sur les acides nucléiques dans une deuxième étape.
- Dans une deuxième variante préférée du procédé, les fonctions diazométhyles sont introduites sur le support solide et les acides nucléiques sont fixés sur le support solide par l'intermédiaire des phosphates des acides nucléiques et en particulier des phosphates terminaux (5' ou 3').

10 L'introduction de phosphate à l'extrémité 3' ou 5' des acides nucléiques est bien connue (voir « Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties » édité par S. Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey).

- 15 Dans un mode de réalisation particulier d'un tel support solide, un réactif de marquage portant un ligand, en particulier un haptène comme la biotine ou l'abiétane, est fixé sur le support solide sur lequel est fixé de manière covalente ou par adsorption un anti-ligand, comme la streptavidine ou un anticorps par exemple. Ces supports solides sont bien connus dans l'état de la technique et sont même commercialement disponibles (plaque de microtitration-streptavidine ou
- 20 latex-streptavidine par exemple). La fonction du marqueur n'est plus dans ce cas de permettre la détection mais de permettre la fixation du réactif de marquage sur le support solide. La fonction diazométhyle est alors disponible pour réagir sur des acides nucléiques. Les dérivés de formule (13), (14), (15) ou le dérivé PDAM sont des exemples de réactifs utilisables pour la fabrication d'un tel support solide. La technique des anticorps monoclonaux permet de préparer des anticorps contre un
- 25 grand nombre de marqueur comme la fluorescéine ou un dérivé du Cy5. L'homme du métier peut mettre en œuvre un support solide avec les réactifs de marquage de la présente invention sans difficulté excessive par ce mode de préparation indirect du support solide dans lequel une réaction ligand/anti-ligand est utilisée pour fixer la fonction diazométhyle sur le support solide.

Un deuxième mode de réalisation du support solide concerne les supports particuliers comme les latex. Différents modes de polymérisation peuvent être utilisés pour préparer les particules portant une fonction diazométhyle à partir d'un monomère fonctionnel polymérisable portant soit une fonction diazométhyle soit préférentiellement une fonction précurseur de la fonction diazométhyle comme un aldéhyde ou une cétone et notamment :

- Polymérisation à réacteur fermé appelée « batch » : les monomères sont introduits dans le réacteur avant le début de réaction avec les autres ingrédients et sans ajout ultérieur. En raison de la différence de réactivité des monomères, ce procédé conduit souvent à l'apparition d'une dérive de composition. Celle-ci se manifeste par l'obtention de macromolécules ayant des compositions qui varient considérablement en fonction de la conversion. Cette méthode est peu efficace pour l'incorporation en surface car une partie importante du monomère fonctionnel risque d'être perdue soit à l'intérieur des particules, soit sous forme de polymère hydrosoluble. Lorsque la copolymérisation est effectuée en « batch » avec des monomères de nature polaire, on obtient des particules plus petites, en grand nombre, mais avec une conversion limitée. Ce comportement est lié à l'importante solubilité dans l'eau de ces monomères, et il est attribué à la prépondérance du mécanisme de nucléation homogène.
- Polymérisation en semi-continu : une partie au moins des monomères est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la réaction et la fin de celle-ci. Ce rajout peut être effectué à une vitesse fixe ou bien suivant un profil donné. Le but est de contrôler l'addition du mélange de monomères de façon à obtenir un copolymère de composition contrôlée (contrôle de la composition de l'interface); c'est ainsi qu'on se place souvent dans des conditions d'addition telles que la vitesse de polymérisation soit plus grande que celle d'addition.
- Polymérisation par addition différée appelée « shot » : une fois que la réaction de polymérisation est en cours, le monomère fonctionnel seul, ou en présence du monomère de base, est introduit dans le système d'une façon contrôlée. Le succès de l'opération dépend donc du degré de connaissance préalable de la cinétique de copolymérisation. C'est une méthode efficace pour favoriser l'incorporation superficielle. La sélection des conditions expérimentales (degré de conversion au moment de l'addition, composition et concentration du mélange des monomères) permet d'optimiser les rendements de surface.

- Polymérisation sur semence : elle consiste à introduire le monomère fonctionnel dans le système contenant un latex déjà constitué et parfaitement caractérisé. Le monomère fonctionnel peut être additionné seul ou en mélange avec le monomère de base de la semence, en une étape ou en semi-continu.

5

Les techniques de polymérisation sur semence, polymérisation par addition différée, polymérisation en semi-continu sont préférées car elles conduisent à un maximum d'incorporation du dérivé portant le précurseur de la fonction diazométhyle en surface. Des exemples de particules portant des fonctions aldéhydes sont donnés par exemple dans B. Charleux et al, Die Makromolecular Chem., 193, p 187 et p. 205, 1992 ou dans le brevet EP-B-0.350.407.

10

Un troisième mode de réalisation du support solide consiste à disposer d'un support solide comprenant une première fonction réactive nucléophile ou électrophile, comme par exemple NH_2 , SH , OH , O-NH_2 , alkylcétone, aldéhyde, isocyanate, isothiocyane, maléimide, halogénure d'alkyle, ester de N-hydroxysuccinimide, tosylate, puis à faire réagir un intermédiaire de fixation, comportant une fonction réactive complémentaire de la première fonction réactive du support solide. Cette réaction entre le support solide et l'intermédiaire de fixation s'effectue en présence, éventuellement, d'un agent de couplage pour former une liaison covalente.

15
20

Un tel support solide comprenant au moins une fonction diazométhyle, selon les différents modes de réalisation décrits ci-dessus, en particulier un support solide sur lequel est fixé indirectement un réactif de marquage de l'invention, est aussi un objet de la présente invention ainsi que le support solide comprenant des acides nucléiques fixés sur le support solide par l'intermédiaire des fonctions diazométhyles.

25

Une première application d'un tel support solide est la fabrication de puces à ADN. Des méthodes existent pour répartir des acides nucléiques sur le support solide en des positions discrètes et prédéterminées.

Le brevet US-A-6,110,426 propose une méthode pour réaliser ces puces à ADN à l'aide d'un capillaire que l'on met en contact sur une surface solide pour délivrer un volume contrôlé de liquide. Un contact effectif a lieu entre l'extrémité du capillaire et le support solide pour que la goutte se dépose par capillarité. De même, le brevet US-A-6,083,763 décrit un ensemble de capillaires
5 couissant dans un dispositif de façon à compenser les différences de hauteur de chacun d'eux. Ils sont amenés au contact d'une surface plane pour le dépôt par capillarité d'oligonucléotides spécifiques.

Le brevet US-A-6,083,762 propose un système de répartition de gouttes comprenant un microdispenseur couplé à un transducteur piézo-électrique pour éjecter des volumes de goutte
10 inférieurs au nanolitre sur une surface solide. Un résultat semblable est obtenu en appliquant une source chaude sur la paroi d'un capillaire pour former une bulle qui éjecte un volume défini de solution (voir T. Okamoto et al., Nature Biotechnology, 18, p438-441, 2000).

La fonction diazométhyle permet ainsi de greffer de manière covalente les acides nucléiques sur le support. Le greffage est simple, la liaison est stable, par rapport à l'adsorption notamment, et
15 la sélectivité de la réaction par rapport au phosphate terminal permet de réaliser un couplage orienté de l'acide nucléique sur le support solide, ce qui facilite d'autant les étapes d'hybridation ultérieures en diminuant l'encombrement stérique.

Une deuxième application d'un support solide selon l'invention est la purification des acides
20 nucléiques.

Dans le cas de la purification, cette purification est soit directe (le support solide porteur de fonctions diazométhyle réagit avec les acides nucléiques à purifier) soit indirecte (des acides nucléiques de capture sont fixés sur le support solide). Ces acides nucléiques de capture sont
25 suffisamment complémentaires de la cible à capturer pour s'hybrider avec le degré de spécificité souhaité et c'est le complexe «acides nucléiques de capture/support solide» qui permet la purification des acides nucléiques cibles.

Le support solide est de préférence sous forme dispersée pour l'utilisation en purification comme des particules de latex, par exemple des particules magnétiques.

Par «étape de purification», on entend notamment la séparation entre les acides nucléiques des micro-organismes et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse qui précède la purification des acides nucléiques. Ces étapes de lyse sont bien connues à titre d'exemple indicatif, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet :

- 5 - WO-A-00/60049 sur la lyse par sonication,
- WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,
- WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et
- WO-A-99/15621 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les traitements par des agents chaotropiques, tels que les sels de guanidium (brevet US-A-5,234,809).

Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques, qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

20 Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être fixé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides, tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; des polymères, des copolymères, notamment à base
25 de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels, etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane, d'une particule ou d'une plaque sensiblement plane de verre ou silicium ou dérivés.

L'invention concerne enfin un procédé de capture d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :

- on dispose d'un support solide sur lequel est fixé directement ou indirectement au moins une molécule comprenant une fonction diazométhyle,
- on met en contact un échantillon biologique susceptible de contenir des acides nucléiques libres, et
- on lave le support solide où la (ou les) molécule(s) sont fixée(s) de manière covalente au moins à un acide nucléique.

Des informations complémentaires peuvent être trouvées dans une autre demande de brevet de la Demanderesse, WO02/090584, déposée sous priorité du 4 mai 2001.

Les exemples et figures ci-joints représentent des modes particuliers de réalisation et ne peuvent pas être considérés comme limitant la portée de la présente invention.

La figure 1 représente les formules développées de différents réactifs utilisés dans la présente invention ainsi que l'abréviation les désignant (o- signifie *ortho*, m- *méta* et p- *para*).

La figure 2 représente la valeur moyenne du signal et le pourcentage de similarité de la m-bio-TETA-PMDAM en fonction de sa concentration pour *rpoB*.

Exemple 1 : Synthèse du réactif de référence : *méta*-BioPMDAM :

• Composé biotine *méta*-acétophénone **1a :**

On solubilise la D-biotine (1,0 gramme (g), 4,1 millimoles (mmol)) dans 45 millilitres (mL) de DMF anhydre à chaud. On refroidit à 0°C sous argon, puis on ajoute successivement la *N*-méthylmorpholine (590 microlitres (μL), 5,33 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (840 μL, 6,60 mmol). On laisse sous agitation pendant 30 minutes (min), puis on ajoute la 3-aminoacétophénone

(824 mg, 6,10 mmol) et la *N*-méthylmorpholine (480 μ L, 4,35 mmol) dans 10 mL de DMF. La solution est maintenue sous agitation à 0°C pendant 2 heures (h), puis on évapore à sec. On reprend le résidu dans 3 mL de MeOH, puis on ajoute 50 mL d'eau. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau, du CH_2Cl_2 et de l'éther pour donner 1,2 g (80 %) de produit **1a** brut. Une recristallisation dans le couple MeOH- H_2O donne **1a** (1,01 g, 70 %) sous forme d'une poudre blanche.

F 145°C. - IR (KBr) : 3280, 2931, 2857, 1691, 1590, 1540, 1487, 1434, 1298, 1266 cm^{-1} . - RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 2,33 (t, J = 8 Hz, 2 H) ; 2,55 (s, 3 H) ; 2,58 ; (d, J = 12 Hz, 1 H) ; 2,83 (dd, J = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,13 (m, 1 H) ; 4,15 (m, 1 H) ; 4,31 (m, 1 H) ; 6,34 (s, 1 H) ; 6,41 (s, 1 H) ; 7,44 (t, J = 8 Hz, 1 H) ; 7,64 (d, J = 8 Hz, 1 H) ; 7,85 (d, J = 8 Hz, 1 H) ; 8,17 (s, 1 H) ; 10,05 (s, 1 H). - MS (FAB/glycérol), m/z : 362 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

• Composé *mé*ta-hydrazone **2a** :

Une solution de **1a** (500 mg, 1,38 mmol) et d'hydrazine monohydrate (200 μ L, 4,15 mmol) dans de l'éthanol absolu (8 mL) est chauffée à reflux pendant 2 h. Après refroidissement à température ambiante, le précipité blanc est filtré, lavé avec de l'eau, puis avec de l'éther et séché. On obtient ainsi 385 mg (74 %) de produit **2a** sous forme d'une poudre blanche.

F 185°C. - IR (KBr) : 3298, 2931, 2857, 1698, 1665, 1626, 1541, 1494, 1470, 1446, 1330, 1265 cm^{-1} . - RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 1,98 (s, 3 H) ; 2,26 (t, J = 8 Hz, 2 H) ; 2,56 ; (d, J = 12 Hz, 1 H) ; 2,81 (dd, J = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,11 (m, 1 H) ; 4,13 (m, 1 H) ; 4,29 (m, 1 H) ; 6,39 (s, 3 H) ; 6,42 (s, 1 H) ; 7,22 (m, 2 H) ; 7,50 (d, J = 8 Hz, 1 H) ; 7,84 (s, 1 H) ; 9,82 (s, 1 H). - MS (FAB/glycérol), m/z : 376 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

• Composé *mé*ta-diazométhane **3a** :

On solubilise **2a** (180 mg, 0,48 mmol) dans 2 mL de DMF. On ajoute alors MnO_2 (340 mg, 3,9 mmol). Après 30 minutes d'agitation à température ordinaire, le mélange est filtré à travers un

entonnoir fritté contenant de la célite (épaisseur : 0,5 cm) et des tamis moléculaires en poudre 3 Å (0,5cm). Le mélange réactionnel est concentré jusqu'à un volume d'environ 0,5 mL, puis 5 mL d'éther sont ajoutés. Le précipité résultant est filtré, lavé à l'éther puis séché. Le composé **3a** (170 mg, 95 %) est obtenu sous forme d'une poudre rose.

5

F 160°C. - IR (KBr) : 3278, 2935, 2859, 2038, 1704, 1666, 1605, 1577, 1536, 1458, 1430, 1263 cm^{-1} . - RMN ^1H (300 MHz) δ = 1,3-1,7 (m, 6 H) ; 2,11 (s, 3 H) ; 2,28 (t, J = 8 Hz, 2 H) ; 2,57 ; (d, J = 12 Hz, 1 H) ; 2,81 (dd, J = 12 et 5 Hz, 1 H) ; 3,11 (m, 1 H) ; 4,13 (m, 1 H) ; 4,29 (m, 1 H) ; 6,33 (s, 1 H) ; 6,41 (s, 1 H) ; 6,60 (m, 1 H) ; 7,25 (m, 3 H) ; 9,84 (s, 1 H).

10

Exemple 2 : Synthèse du réactif N-(3,6,9-triaminenonanyl)-biotinamide (Bio-TETA) (1) :

La D-biotine (2,80 g, 11,40 mmol) est dissoute dans 30 mL de DMF anhydre. L'ajout du carbonyldiimidazole (1,5 éq. ; 2,78 g) provoque après quelques minutes la formation d'un précipité.

15 Après 30 min d'activation, la suspension qui résulte est ajoutée doucement sur la triéthylènetétramine (2 éq. ; 5,00 g) en suspension dans 20 mL de DMF. La réaction est laissée 2h sur bain d'huile à 60°C.

Le produit est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 20 : 80 : 3. Après évaporation des fractions concernées, on obtient 1,94 g
20 de produit en forme d'une poudre blanche (46 %).

RMN- ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ = 7,75 (s, 1H, -NH-CO-) ; 6,40 (d, 2H, -NH- biot) ; 4,30 (t, 1H, -CH- biot) ; 4,15 (d, 1H, -CH- biot) ; 3,30 (m, 12H, - CH_2 -NH-) ; 3,11 (m, 1H, -CH-S-) ; 2,8 (dd, 2H, -CH $_2$ -S-) ; 2,55 (m, 5H, - NH -CH $_2$ - & -NH $_2$) ; 2,04 (t, 2H, -CH $_2$ -CO-) ; 1,52 (m, 6H, -CH $_2$ -).

25

Acide N-(3'-acétophényl)-succinamique (ACBA) (2)

La 3-aminoacétophénone (5,0 g ; 37 mmol) est dissoute dans 50 mL d'acétonitrile anhydre sous argon. On ajoute l'anhydride succinique (1,3 éq. ; 4,62 g) et on laisse réagir une heure sous argon. Le produit **2** apparaît en forme de précipité. Après filtration et lavage à l'éther du précipité, on

obtient 7,29 g de poudre blanche (84 %).

RMN-¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,10 (s, 1H, -OH) ; 10,17 (s, 1H, -NH-) ; 8,19 (s, 1H) ; 7,82 (d, 1H) ; 7,66 (d, 1H) ; 7,50 (t, 1H) ; 2,56 (m, 7H, -(CH₂)₂- et -CH₃).

5 *N*-(3'-acétophényl)-*N'*-(3,6-diamine-9-biotinoylaminononanyl)-succinamide (Bio-(TETA)-AP) (3)

L'ACBA (2) (1,03 g ; 4,39 mmol) est dissoute dans 20 mL de DMF anhydre sous argon. Le milieu est refroidi dans la glace, et on ajoute successivement *N*-méthylmorpholine (1,25 éq. ; 725 µL) et chloroformiate d'isobutyle (1 éq. ; 690 µL) : le milieu devient trouble après 30 min. En parallèle, la
10 Bio-TETA (1) (0,8 éq. ; 1,94 g) est solubilisée à chaud dans 50 mL de DMF et de triéthylamine (0,8 éq. ; 750 µL). Elle est ajoutée à l'ACBA activée à 0°C, pendant 30 min. On laisse ensuite à température ambiante sur la nuit. La purification se fait par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 85 : 30 : 3. Les fractions contenant le produit 3 sont réunies et le solvant évaporé. On obtient 1,01 g de solide blanc en forme de paillettes (33%).

15 RMN-¹H (200 MHz, DMSO- d₆) δ = 10,16 (s, 1H, Ph-NH-CO-) ; 8,18 (s, 1H) ; 7,97 (s, 1H, -CO-NH-CH₂-) ; 7,80 (d, 1H) ; 7,85 (s, 1H, -CH₂-NH-CO-) ; 7,60 (d, 1H) ; 7,43 (t, 1H) ; 6,38 (d, 2H, -NH- biot) ; 4,3 (t, 1H, -CH- biot) ; 4,10 (d, 1H, -CH- biot) ; 3,35 (m, 12H, -CH₂-NH-) ; 3,10 (m, 1H, -CH-S-) ; 2,80 (dd, 2H, -CH₂-S-) ; 2,60 (s, 4H, -CH₂-CO-) ; 2,55 (s, 3H, -CO-CH₃) ; 2,50 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CO-) ; 2,15 (m, 2H, -NH-) ; 1,40 (m, 6H, -CH₂-).

20

N-[3'-(1-hydrazono-éthyl)-phényl]-*N'*-(3,6-diamine-9-biotinoylaminononanyl)-succinamide (Bio-(TETA)-Hy) (4)

La Bio-(TETA)-AP (3) (1,0 g ; 1,71 mmol) est mise en suspension dans 25 mL d'éthanol à chaud (60°C). A reflux, on ajoute l'hydrazine monohydrate (9 éq. ; 750 µL). La réaction est laissée à reflux
25 pendant 2h, puis refroidie sur glace. Un précipité se forme après quelques moments. Les deux phases sont séparées et le précipité est mis sous vide. On obtient 690 mg d'un solide floconneux (68%).

RMN-¹H (200 MHz, DMSO- d₆) δ = 9,95 (s, 1H, Ph-NH-CO-) ; 8,0 (s, 1H, -CO-NH-CH₂-) ; 7,90 (s, 1H) ; 7,80 (s, 1H, -CH₂-NH-CO-) ; 7,5 (d, 1H) ; 7,28 (m, 2H) ; 6,41 (s, 1H, -NH- biot)

; 6,36 (d, 3H, -NH- biot & -NH₂) ; 4,64 (t, 1H, -CH- biot) ; 4,30 (d, 1H, -CH- biot) ; 3,43 (m, 12H, -CH₂-NH-) ; 3,12 (m, 1H, -CH-S-) ; 2,80 (dd, 2H, -CH₂-S-) ; 2,60 (s, 4H, -CH₂-CO-) ; 2,50 (s, 3H, -CO-CH₃) ; 2,10 (m, 2H, -CH₂-NH-CH₂-) ; 1,50 (m, 6H, -CH₂-).

5 *N*-[3'-(1-diazo-éthyl)-phényl]-*N'*-(3,6-diamine-9-biotinoylaminononanyl)-succinamide (m-Bio-(TETA)-PMDAM) (5)

La Bio-(TETA)-Hy (4) (150 mg ; 250,4 μmol) est solubilisée dans 1 mL de DMSO anhydre sous argon. On laisse réagir 30 minutes avec MnO₂ (s) (15 éq. ; 330 mg) puis on filtre sur fritté n°4 avec de la célite (0,5 cm d'épaisseur) et du tamis moléculaire 3 Å (0,5 cm d'épaisseur). 100 μL sont
10 utilisés pour la RMN avec ajout de 380 μL de DMSO-d₆ et 20 μL de méthanol-d₄. On ajuste le volume final à 4,5 mL avec DMSO anhydre et 4% de méthanol. On aliquote dans une boîte à gants sous Argon par 250 μL. Le composé est rose fuchsia. Le degré de pureté (contenu en diazométhyle) est contrôlé par RMN ¹H et spectrophotométrie UV-vis (pic d'absorbance du diazométhyle à 516 nm).

15 RMN-¹H (200 MHz, DMSO- d₆) δ = 9,93 (s, 1H, Ph-NH-CO-) ; 7,3 (s, 3H, H_{aromatiques}) ; 6,6 (s, 1H, H_{aromatique}) ; 6,4 (s, 1H, -NH- biot) ; 6,3 (s, 1H, -NH- biot) ; 4,3 (t, 1H, -CH- biot) ; 3,3 (m, 12H, -CH₂-NH-) ; 3,3 (m, 1H, -CH-S-) ; 2,9 (dd, 2H, -CH₂-S-) ; 2,5 (4H, -CH₂-CO-) ; 2,1 (s, 3H, -CH₃) ; 2,0 (m, 2H, -CH₂-NH-CH₂-) ; 1,50 (m, 6H, -CH₂-).

20

Exemple 3 : Préparation des acides nucléiques ADN et ARN :

Exemple 3.1 : Préparation des amplicons ADN :

25 Les amplicons ADN sont générés par PCR à partir de cibles d'ADN génomique *Mycobacterium tuberculosis* 16S (10⁺⁴ copies comme cibles de départ) en utilisant le kit Fast Start de Roche, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP), 0,3 μM d'amorces et 0,4 μL d'enzyme.

Les paramètres de la PCR sont les suivants :

- 95°C : 4 mn puis 35 cycles (95°C : 30 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 30 sec) puis 4°C.

Les amplicons sont analysés qualitativement par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%, TBE 0,5X). Le volume déposé est de 5 µL et la migration s'effectue durant 20 mn à 100 Volts (V). La visualisation des produits PCR est réalisée sous lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

- 5 Les conditions pour la culture, l'extraction des Mycobactéries ainsi que les amorces d'amplification sont données dans la demande de brevet WO-A-99/65926.

Exemple 3.2 : Préparation des ARN transcrits :

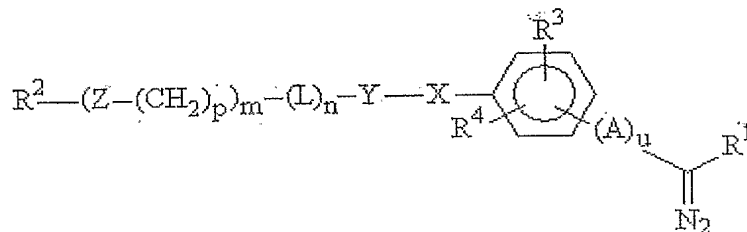
- 10 Les transcriptions sont réalisées à partir de cible PCR (fragment de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*) en utilisant le kit MEGAscript d'Ambion : 7,5 mM de chaque nucléotide (ATP, CTP, GTP et UTP) et 2 µL d'enzyme (ARN polymérase). Le temps d'incubation est de 3 heures (h) à 37 °C. Les amorces d'amplification de la PCR portent un promoteur de polymérase T3 ou T7, comme décrit dans la demande WO-A-99/65926 ou dans l'article J. Clin Microbiol. 37(1), p 49-55, 1999,
- 15 ce qui permet de réaliser la transcription.

Les transcrits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% ; TBE 0,5X). Le volume déposé est de 5 µL et la migration s'effectue durant 20 mn à 100V. La visualisation des transcrits est réalisée sous lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

- Des résultats identiques du point de vue de l'invention peuvent être obtenus en utilisant d'autres
- 20 techniques d'amplification comme la NASBA ou TMA, qui génèrent directement des amplicons ARN.

REVENDEICATIONS

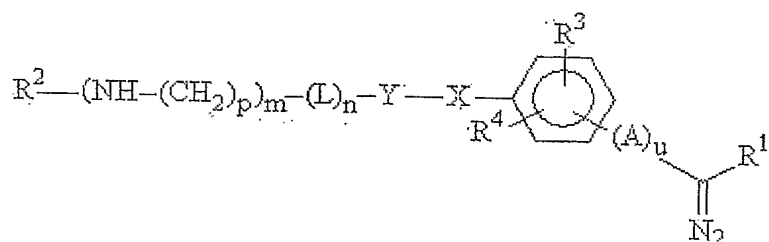
1. Réactif de marquage stable à la température de formule (0) :



5 dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1,
- $-Y-X-$ représente $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$,
- $-Z-$ représente $-\text{NH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CONH}-$ ou $-\text{O}-$,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

2. Réactif de marquage, selon la revendication 1, de formule (1) :

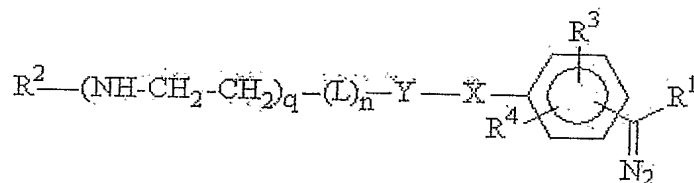


dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle, et
- $-Y-X-$ représente $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

3. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que p est inférieur ou égal à m.

4. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, de formule (2) :

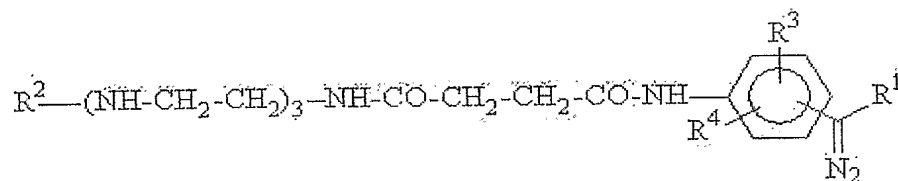


dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,

- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, -
5 $\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle, et
- q est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3

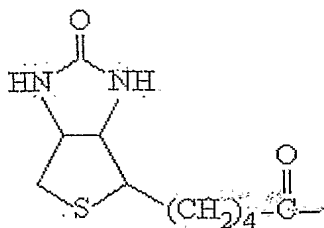
5. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, de formule (3) :



10 dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes
15 et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, -
 $\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle.

20 6. Réactif, selon la revendication 5, caractérisé par le fait que R^2 est constitué par un résidu D-Biotine de formule (4):

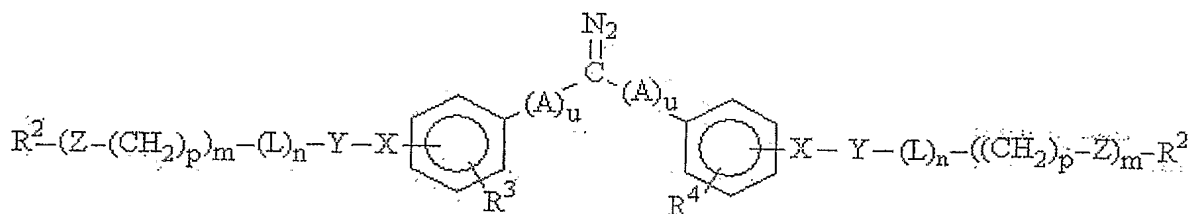


7. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que R^1 est constitué de : CH_3 , et R^3 et R^4 représentent chacun : H

8. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle la structure $-(L)_n$ est constituée par :

- la spermine ou N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane : $NH_2-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, ou
- la spermidine ou N-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamine : $H_2N-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, ou
- un dérivé contenant un motif alanine : $NH_2-CH_2-CH_2-COOH$.

9. Réactif de marquage stable à la température de formule (6) :

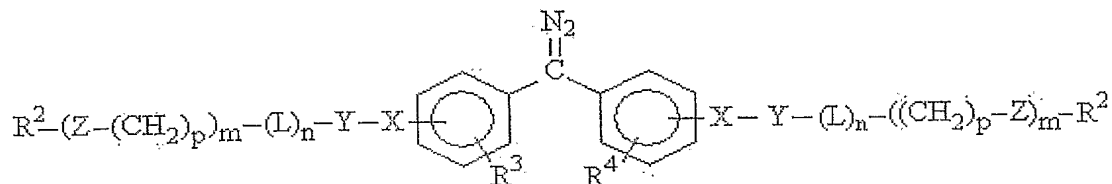


dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$, $COOR$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2-NH-R^2$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_4-CH_2-NH-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazo avec le cycle aromatique et u est un nombre entier compris entre 0 et 2, préférentiellement de 0 ou 1,
- $-Y-X-$ représente $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$,
- $-Z-$ représente $-NH-$, $-NHCO-$, $-CONH-$ ou $-O-$,

- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

10. Réactif de marquage, selon la revendication 9, de formule (7) :



dans laquelle :

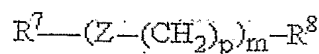
- R^1 représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- R^2 représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- $-Y-X-$ représente $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$,
- $-Z-$ représente $-\text{NH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CONH}-$ ou $-\text{O}-$,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3, et
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3.

11. Réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait que L comprend un motif $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)-$, répété de 1 à 20 fois, préférentiellement de 1 à 10 fois, et encore plus préférentiellement de 2 à 5 fois, $-Z-$ étant alors représenté par $-\text{NH}-$, $-\text{NHCO}-$ ou $-\text{CONH}-$.

12. Procédé de synthèse d'un réactif de marquage, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un marqueur ou d'un précurseur de marqueur possédant une fonction réactive R^6 ,

b) on dispose d'un bras de liaison de formule (8) :

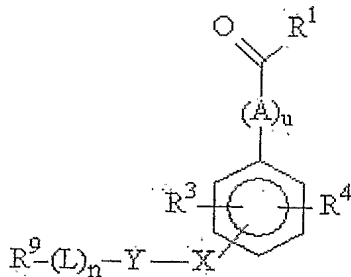


5 dans laquelle :

- -Z- représente -NH-, -NHCO-, -CONH- ou -O-,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3,
- p est un nombre entier compris entre 1 et 10, préférentiellement entre 1 et 3,
- R^7 et R^8 représentent deux fonctions réactives identiques ou différentes,

10 c) on fait réagir ensemble la fonction réactive R^6 dudit marqueur ou précurseur de marqueur avec la fonction R^7 du bras de liaison de formule (8) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une liaison covalente, R^6 et R^7 étant complémentaires,

d) on dispose d'un dérivé de formule (9) :



15 dans laquelle :

- R^1 représente H ou un groupe alkyle ou aryle ou aryle substitué,
- L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1,
- R^3 et R^4 représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X$, OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$, $COOR$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2-NH-R^2$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_4-CH_2-NH-R^2$ avec R = alkyle ou aryle,
- -Y-X- représente -CONH-, -NHCO-, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$,
- A est un bras de liaison comportant au moins une double liaison covalente permettant la conjugaison de la fonction diazométhyle avec le cycle aromatique et u est un nombre entier égal à

20

0 ou 1, et

- R^9 représente une fonction réactive complémentaire de R^8 ,

e) on fait réagir ensemble la fonction réactive R^9 du dérivé de formule (9) avec la fonction R^8 du bras de liaison de formule (8) en présence d'au moins un agent de couplage pour former une
5 liaison covalente,

f) on fait réagir l'hydrazine ou un de ses dérivés sur la fonction cétone ou aldéhyde pour former une hydrazone, et

g) on transforme l'hydrazone en fonction diazométhyle à l'aide d'un traitement approprié.

10 13. Procédé de synthèse, selon la revendication 12, caractérisé par le fait qu'il comprend :

- une étape supplémentaire de protection de la fonction cétone ou aldéhyde du composé (9), et
- une étape supplémentaire ultérieure de déprotection de ladite fonction cétone ou aldéhyde.

15 14. Procédé pour le marquage d'une molécule biologique, en particulier un acide nucléique, comprenant la mise en contact en solution homogène, dans un tampon sensiblement aqueux, d'une molécule biologique et d'un réactif, obtenu selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

15 15. Molécule biologique marquée susceptible d'être obtenue par le procédé, selon la revendication 14.

20

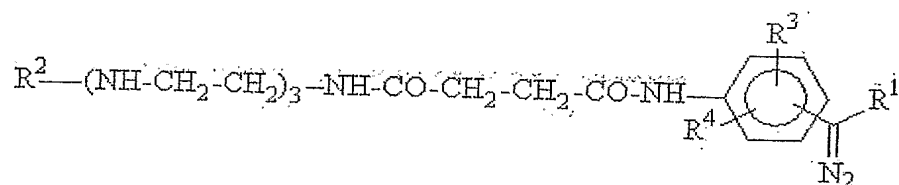
16. Procédé de marquage et de fragmentation d'un acide nucléique simple ou double brin comprenant les étapes suivantes :

- fragmenter l'acide nucléique,
- attacher un marqueur sur au moins un des fragments par l'intermédiaire d'un réactif de marquage

25 choisi parmi les réactifs, obtenus selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,

ledit réactif se couplant de manière covalente et majoritaire sur au moins un phosphate dudit fragment.

17. Procédé, selon la revendication 16, caractérisé par le fait que le réactif de marquage est choisi parmi les composés de formule (3) :



dans laquelle :

- 5 * R¹ représente H ou un groupe alkyle, aryle ou aryle substitué,
- * R² représente un marqueur détectable ou au moins deux marqueurs détectables reliés entre eux par au moins une structure multimérique,
- * L est un bras de liaison comportant un enchaînement linéaire d'au moins deux liaisons covalentes et n un nombre entier égal à 0 ou 1, et
- 10 * R³ et R⁴ représentent indépendamment l'un de l'autre : H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² avec R = alkyle ou aryle.

18. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17, caractérisé par le fait
15 que la fragmentation et le marquage sont effectués en deux étapes.

19. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 16 à 17, caractérisé par le fait que la fragmentation et le marquage sont effectués en une étape.

20 20. Procédé, selon l'un quelconque des revendications 18 à 17, caractérisé par le fait que le marquage s'effectue en solution homogène sensiblement aqueuse.

21. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 16 à 20, caractérisé par le fait que la fragmentation s'effectue par voie enzymatique, physique ou chimique.

22. Acide nucléique marqué susceptible d'être obtenu par le procédé, selon l'une quelconque des revendications 16 à 21.

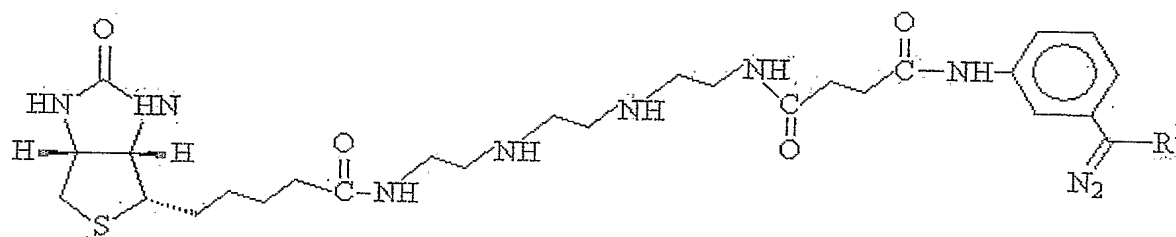
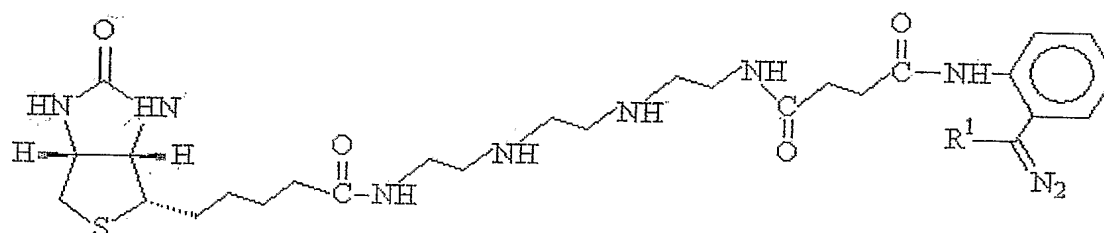
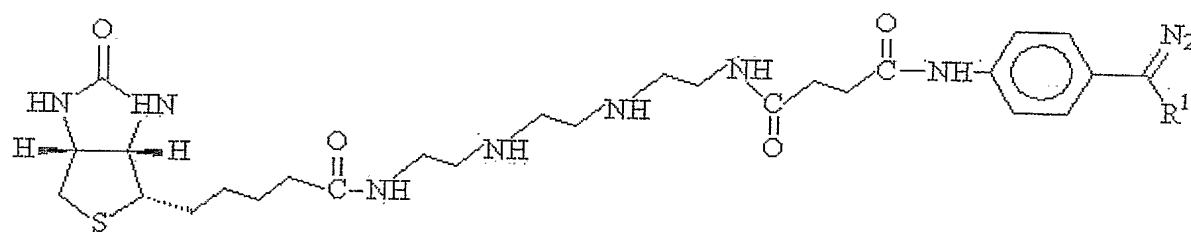
23. Kit de détection d'un acide nucléique cible comprenant un acide nucléique marqué,
5 selon la revendication 22.

24. Support solide sur lequel est fixé un réactif, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

10 25. Procédé de capture d'acides nucléiques comprenant les étapes suivantes :

- on dispose d'un support solide sur lequel est fixé directement ou indirectement au moins une molécule biologique, selon la revendication 15, ou un acide nucléique, selon la revendication 22, la molécule biologique ou l'acide nucléique comprenant une fonction diazométhyle,
- on met en contact un échantillon biologique susceptible de contenir des acides nucléiques libres,
15 et
- on lave le support solide où la (ou les) molécule(s) sont fixée(s) de manière covalente au moins à un acide nucléique.

1 / 2

*m*-bio-TETA-PMDAM (13)*o*-bio-TETA-PMDAM (14)*p*-bio-TETA-PMDAM (15)**Figure 1**

2 / 2

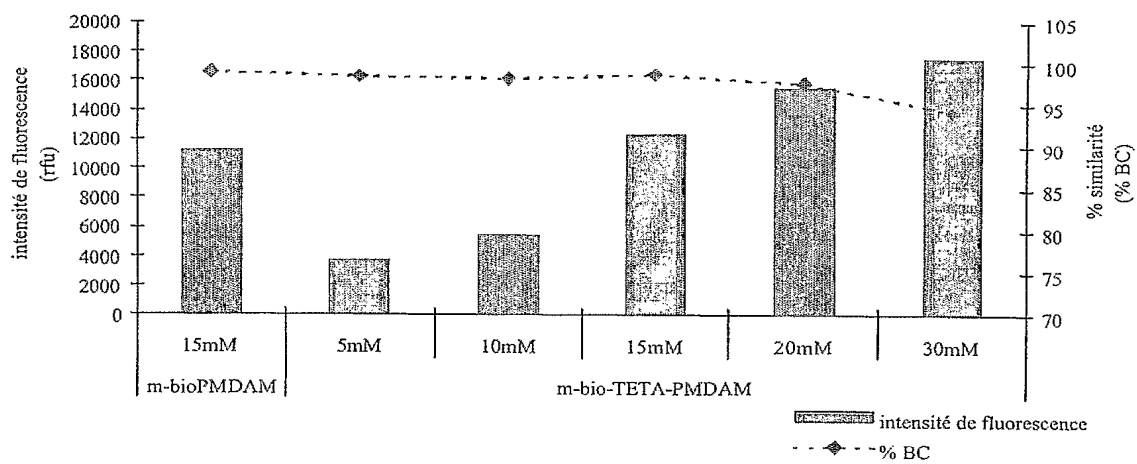
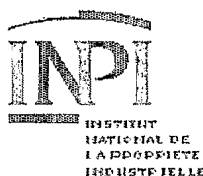


Figure 2

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITE****Désignation de l'inventeur**

Vos références pour ce dossier	DIAZO TETA
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	Réactifs de marquage, procédés de synthèse de tels réactifs et procédés de détection de molécules biologiques
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	LAAYOUN
Prénoms	ALI
Rue	Allée des Narcisses
Code postal et ville	69780 TOUSSIEU
Société d'appartenance	bioMérieux
Inventeur 2	
Nom	BERNAL-MENDEZ
Prénoms	Eloy
Rue	Chemin des Géliots-Montjay
Code postal et ville	38070 SAINT QUENTIN FALLAVIER
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, BIOMERIEUX, V.Bitaud

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

PCT/FR2005/050192

